79. K. ADANK, D. BOVET, A. DUCKE e G. B. MARINI-BETTÒLO. — **Ricerche sugli alcaloidi curarizzanti di varie specie di Strychnos del Brasile. Gli alcaloidi della Strychnos trinervis (Vell.) Mart.** — Nota I.

Riassunto. — Sono stati studiati per sette specie di *Strychnos* (*S. divaricans* Ducke, *S. Froesii* Ducke, *S. glabra Sagot*, *S. guianensis* (Aubl.) Mart., *S. rubiginosa* D. C., *S. tomentosa* Benth., ed *S. trinervis* (Vell.) Mart. la tossicità globale, l'attività curarica e il contenuto in alcaloidi.

Lo studio cromatografico degli alcaloidi della *S. trinervis* ha consentito mettere in evidenza la presenza di 23 alcaloidi e di identificare la C-calebassina, la C-curarina, la C-fluorocurarina e la C-fluorocurinina, gli alcaloidi H e K del gruppo della tossiferina e l'alcaloide J, di cui gli ultimi tre non erano stati finora ritrovati nelle piante.

Résumé. — Pour sept espèces de Strychnos (*S. divaricans* Ducke, *S. Froesii* Ducke, *S. glabra* Sagot, *S. guianensis* (Aubl.) Mart, *S. rubiginosa* D. C., *S. tomentosa* Benth., et *S. trinervis* (Vell.) Mart., on a étudié la toxicité globale, l'activité curarisante et le contenu en alcaloïdes.

L'étude chromatographique des alcaloïdes de la *S. trinervis* a permis de mettre en évidence la présence de 23 alcaloïdes et d'identifier la C-calebassine, la C-curarine, la C-fluorocurarine et la C-fluorocurinine, les alcaloïdes H et K du groupe de la toxiférine et l'alcaloïde J; les trois derniers n'avaient pas été jusqu'ici trouvés dans les plantes.

Summary. — The total toxicity, curarizing activity and alkaloid content of seven species of Strychnos were studies — *S. divaricans* Ducke, *S. Froesii* Ducke, *S. glabra* Sagot, *S. guianensis* (Aubl.). Mart, *S. rubiginosa* D. C., *S. tomentosa* Benth., and *S. trinervis* (Vell.) Mart.

Chromatographic study of the alkaloids of *S. trinervis* made it possible to establish the presence of 23 alkaloids and to identify C-calebassin, C-curarine, C-fluorocurarine and C-fluorocurinine, the H and K alkaloids of the toxipherine group and the J alkaloid. The last three of these have not hitherto been discovered in plants.

Zusammenfassung. — Die Gesamttoxizität, die Curareaktivität und der Alkaloidgehalt wurden bei sieben Arten der Strychnos (*S. divaricans* Ducke, *S. Froesii* Ducke, *S. glabra* Sagot, *S. guainensis* (Aubl.) Mart, *S. rubiginosa* D. C., *S. tomentosa* Benth. und *S. trinervis* (Vell.) Mart untersucht.

Die chromatographische Untersuchung der Alkaloide der *S. trinervis* zeigte das Vorhandensein von 23 Alkaloiden und gestattete die Identifizierung von C-Calebassin, C-Curarin, C-Fluorocurarin und C. Fluorocurinin sowie der Alkaloide H und K der Toxiferingruppe und des Alkaloid J, von denen die letzteren drei bis her noch nicht in Pflanzen gefunden worden waren.

Mentre vi sono numerosi studi tendenti ad isolare dai curari di calebasse, elaborati dagli indigeni, gli alcaloidi in essi contenuti, relativamente poche sono le ricerche da un punto di vista chimico sulle *Strychnos* che si ritiene costituiscano la materia prima più importante per la loro preparazione.

Berredo de Carneiro [1] è stato il primo ad isolare da una *Strychnos*, *S. letalis*, degli alcaloidi, la stricnoletalina e la curaletalina che in seguito ha ritrovato in alcuni curari.

Wieland nel 1941 [2] ha messo in evidenza nella *S. toxifera* la presenza di alcuni alcaloidi già ritrovati nei curari di calebasse e cioè la C-tossiferina I e la C-tossiferina II, identica quest'ultima alla C-calebassina di Karrer [3].

Nel 1949 King ha descritto l'estrazione della *S. diaboli* dallà Diabolina e dalla *S. toxifera Rob.* delle tossiferine I-XII [4].

Più recentemente Schlittler isolava dalla *S. Melinoniana* [5] due nuovi alcaloidi, la Melinonina A e B che però non risultano attivi come curari e che finora non sono stati ritrovati nelle calebasse.

Nel 1953 Karrer, Kebrle e Schmid [6] hanno identificato nella corteccia della *S. Mitscherlichii* una ventina di alcaloidi e precisamente la C-calebassina, la C-curarina, i C-alcaloidi dei così detti gruppi I e dei gruppi B, C, D, la fluorocurina e la C-fluocurarina, e cosa più interessante li hanno ritrovati nelle medesime proporzioni in cui si trovano in numerosi curari di calebasse.

---

(1) Bull. Soc. chim. biol., *21*, 282, 1339 (1939).
(2) Wieland, Bähr e Witkop. Ann., *547*, 140 (1941).
(3) Schmid, Ebnöther e Karrer, Helvetica Chim. Acta, *33*, 1486 (1950).
(4) J. Chem. Soc., *1949*, 955, 3263.
(5) Schlittler e Hohl, Helvetica Chim. Acta, *35*, 29 (1952).
(6) Kebrle, Schmid, Waser e Karrer, Helvetica Chim. Acta, *36*, 345 (1953).

Tali risultati sono stati resi possibili dal previo studio effettuato dagli stessi Autori sui curari di calebasse (7), che erano stati purificati per cromatografia su colonna di cellulosa e quindi sottoposti alla cromatografia su carta. In tal modo era stato possibile determinare i valori degli R_c di una ventina di alcaloidi. Inoltre sugli alcaloidi purificati era stato stabilito in base al loro comportamento cromatografico e alle colorazioni presentate con i diversi reattivi un sistema per classificare e suddividere gli alcaloidi dei curari delle calebasse in diversi gruppi fornendo così una base di orientamento per le successive ricerche.

Nell'intento di portare un contributo allo studio degli alcaloidi *Strychnos* del Brasile abbiamo, già nel luglio 1952, stabilito una collaborazione fra l'Instituto Agronomico del Norte di Belém per la parte botanica e l'Istituto Superiore di Sanità per le ricerche chimiche e farmacologiche. Sette specie di *Strychnos* sono state esaminate ed in particolare la *S. trinervis*, la *S. tomentosa*, la *S. Froesi*, la *S. guianensis*, la *S. divaricans*, la *S. glabra* e la *S. rubiginosa*, di cui solo una *S. guianensis* e una *S. trinervis* sarebbero state in precedenza oggetto di ricerche (vedi tab. I).

Estrazione degli alcaloidi totali dalle S. divaricans, S. glabra, S. guianensis, S. Froesii, S. rubiginosa, S. Tomentosa, S. trinervis

L'abbondante e vario materiale botanico di cui disponevamo e che era sicuramente determinato, è stato per prima saggiato rispetto alla tossicità del suo contenuto, riferendo la tossicità a un peso determinato di corteccia; in tal modo è possibile stabilire l'attività della pianta.

Dopo alcuni saggi orientativi abbiamo effettuato l'estrazione del materiale polverizzato con una soluzione acquosa di acido tartarico all'1% come indicato da King (4), che secondo la nostra esperienza ed in confronto ai metodi impiegati da altri Autori è il sistema che consente una estrazione più completa degli alcaloidi.

Sull'estratto è stata valutata, mediante precipitazione con il reattivo di Tanret la quantità di alcaloidi presenti.

E' stata inoltre determinata l'attività biologica sia con prove di tossicità nel topino, sia con la misura della curarizzazione nel *Rectus abdominis* del Rospo.

---

(7) Schmid e Karrer, Helvetica Chim. Acta, *33*, 512 (1952); Schmid, Kebrle e Karrer, ibidem, *35*, 1864 (1952); Kebrle, Schmid, Waser e Karrer, ibidem, *36*, 102 (1953).

TABELLA I.

Strychnos adoperate per curari	Alcaloidi nella corteccia	Azione curarica	Autori e letteratura
S. Castelnaei (Castelnaeana) Wedd.	0,4% dei quali $^1/_2$ quaternari	debole	SCHWACKE (8) FOLKERS (9) KING (4)
S. diaboli Sandw. . .	*a*) assenti *b*) quatern. e terziari (Diabolina)	senza senza	KING (4) WEST (10)
S. Erichsonii Rich. Schomb.	contiene alc.; assenti quaternari	nessuna	KING (4) WEST (10)
S. Gardneri A. DC. . .	senza indicazione	si	DE LACERDA (11)
S. Gubleri G. Planch.	senza indicazione	si	PLANCHON (12)
S. guianensis (Aubl.) Mart.	contiene alc.	debole	KING (4) WEST (10)
S. simile guianensis . .	*a*) contiene alc. *b*) assenti	si no	KING (4) WEST (10)
S. hirsuta	senza indicazione	da un curaro meno forte della S. Castelnaei Wedd.	SCHWACKE (13)
S. simile hirsuta . .	contiene alc.	si	KING (4) WEST (10)
S. Jobertiana Baill. . .	senza indicazione	debole	FOLKERS (9)
S. letalis Barbosa Rodriguez	stricnoletalina curaletalina alcaloidi quaternari	si	CARNEIRO (1)
S. Melinoniana Baill. .	alcaloidi quaternari: Melinonina A Melinonina B	nessuna	SCHLITTLER (5)

(8) Jahrb. kgl. bot. Garten (Berlin), *3*, 220 (1884).
(9) J. Am. Pharm. Assoc., *27*, 689 (1938).
(10) Arch. Int. Pharmacodyn. et Therap., *56*, 81 (1937).
(11) COUTY e DE LACERDA, Compt. rend., *89*, 582, 1034 (1879).
(12) Compt. rend., *90*, 134 (1880).
(13) Jahrb. kgl. bot. Garten (Berlin), *3*, 232 (1884).

Segue: TABELLA I.

Strychnos adoperate per curari	Alcaloidi nella corteccia	Azione curarica	Autori e letteratura
S. Mitscherlichii Rich. Schomb.	*a*) assenti *b*) contiene alc. *c*) C-Fluorocurinina C-Fluorocurarina C-Curarina C-Calebassina C-Alcaloide I C-alcaloidi del gruppo B, C, D ed altri 12 alc. non caratterizzati	nessuna debole debole	KING (4) WEST (10) KARRER (6)
S. Peckii B. L. Robinson	senza indicazione	si	FOLKERS (9)
S. rubiginosa DC. . .	senza indicazione	si estratto tossico	JOBERT (14)
S. solimoesana Kruk. .	senza indicazione	si	CARNEIRO (1)
S. toxifera Rob. Schomb.	Tossiferina I Tossiferina II Tossiferina II-a Tossiferina II-b Tossiferina I-XII Stricnotossina I Stricnotossina I-a Stricnotossina II Stricnotossina II-a Stricnotossina II-b	forte forte forte	H. WIELAND (15) KING (4) Th. WIELAND (15)
S. trinervis (Vell.) Mart.	senza indicazione	si	DE LACERDA (11) BRAZIL (17)

Oltre a queste piante anche le seguenti, che non sono però state studiate chimicamente vengono impiegate dagli indiani per la preparazione del curaro.

S. brachiata Ruiz. e Pav. (18), *S. cogens* (19), *S. depauperata* H. B. (19), *S. nigricans* (19), *S. pedunculata* (A.DC.) Bentham (20), *S. Solerederi* Gilg. (var. S. Melinoniana Baill.) (21), *S. subcordata Spruce* (14, 18). *S. yapurensis* G. Planch (22).

---

(14) Compt. rend., *86*, 121 (1878).

(15) WIELAND, BÄHR e WITKOP, Ann., *547*, 156 (1941); WIELAND, WITKOP e BÄHR Ann., *558*, 144 (1947).

(16) Ber., *85*, 731 (1952).

(17) BRAZIL, CAMPOS e KUHLMAN, O. Hosp. (Rio de Janeiro), *21*, 55 (1942).

(18) KRUKOFF, Brittonia, *4*, 248 (1942); *5*, 21 (1943); *6*, 343 (1948).

(19) TSCHIRCH, Handbuch der Pharmacognosie, vol. 3, pag. 463, Verlag Tauchnitz Leipzig (1923)

(20) J. Linn. Soc., *1*, 105 (1856).

(21) BAILLON, Bull. Soc. Linn., *1*, 256 (1880).

(22) CREVAUX, Compt. rend., *89*, 1023 (1879).

I risultati di questa ricerca mettono in evidenza la spiccata attività curarica della *S. trinervis* e una minore attività ma sempre notevole nella *S. rubiginosa*, meno attive sono la *S. divaricans*, la *S. Froesi* e la *S. tomentosa* (vedi tab. II).

TABELLA II.

CONTENUTO DI ALCALOIDI E ATTIVITÀ FARMACOLOGICA DELLE VARIE STRYCHNOS

Specie	Contenuto di alcaloidi	Attività curarica	Peso di piante sufficiente per provocare la morte di 1 kg. di animale (prove sul topino, iniez. e. p.)
S. divaricans Ducke . . .	+	debole	4 g
S. Froesii Ducke	+ +	debole	8 g
S. glabra Sagot	+	nessuna	10 g
S. guianensis (Aubl.) Mart. .	+ +	debole	0,3 g
S. rubiginosa D. C. . . .	+ + +	forte	0,8 g
S. tomentosa Benth. . . .	+ + +	debole	2 g
S. trinervis (Vell.) Mart. . .	+ + +	fortissima	0,08 g

La *S. glabra* invece seppure ricca in alcaloidi presenta un'azione curarica così debole nelle prove sul muscolo isolato, che si deve pensare che la tossicità che manifesta sia dovuta ad un'attività farmacologica di tipo diverso (tab. III).

Particolarmente tossico si è dimostrata la *S. trinervis;* infatti tenendo conto dell'attività e della ricchezza di alcaloidi si può considerare che 0,08 g di corteccia rappresentano la dose minima tossica per 1 kg di animale.

STUDIO DEGLI ALCALOIDI DELLA S. TRINERVIS (VELL.) MART

Date le notevoli proprietà presentate dalla *S. trinervis* ci è sembrato conveniente procedere con questa pianta al riconoscimento dei vari alcaloidi.

A questo scopo dall'estratto della pianta sono stati precipitati gli alcaloidi con il sale di Reinecke, secondo il metodo di PANOUSE [23] e trasformati quindi, per trattamento con solfato di argento e cloruro di bario, secondo KAPFHAMMER [24] nei rispettivi cloruri.

I cloruri degli alcaloidi della *S. trinervis* così ottenuti son stati sot-

---

[23] Bull. Soc. chim., *16*, 394 (1949).
[24] Z. physiol. Chem., *191*, 182 (1930).

TABELLA III.

Specie	Metodo di estrazione	Colore dell'estratto	Contenuto di alcaloidi (reattivo di Tanret)	Tossicità D. L. 50 topino e.p. cc kg (1)	Azione curarica Retto addom. rospo; dose attiva (cc/litro di soluz. Ringer (3)
1) S. divaricans	I	rosso scuro	+	10-15	2
2) S. Froesii	I	rossastro	+ +	20 25	5
	II	giallo	+	100	ø
	III	rosso	+	50 75	ø
	IV		+	10-15	10
3) S. glabra	I	rosso scuro	+	25-37	ø
S. guianensis	I	rosso	+ +	0.75–1	2,5
S. rubiginosa	I	rosso scuro (torbido)	+ + +	1-2,5	0,3
	II	rosso	+	5	—
	III	rosso scuro	+ +	2,54	—
	IV	rossastro	+	7,5-10	—
S. tomentosa	I	rosso	+ + +	5-7.5	2
S. trinervis	I	bruno-rosso (torbido)	+ + +	0 2-0,25	0.1
	II	rosso scuro	+ +	0 25-0,4	—
	III	rosso	+	1	—
	IV	rossastro	+	5-7,5	—

I Percolazione con soluzione di 1% di acido tartarico.
II Percolazione con acqua distillata.
III Percolazione con metanolo + 3% acido acetico.
IV Il percolato viene alcalinizzato ed estratto con $CHCl_3$, il solvente evaporato ed il residuo ripreso con soluzione tartarica all'1%.
1 cm³ dell'estratto tossico per 1 kg di animale.
2 mg/kg di piante; calcolate per DL 50 di d-tubo-curarina = 0,75 mg/kg (topino e.p.).
3 cm³ dell'estratto/litro di soluzione Ringer; sufficiente per produrre un'inibizione del 50% della contrattura acetilcolinica (1 mg/l).
4 mg/kg di pianta, calcolato per una concentrazione attiva di d-tubocurarina di 0,5 mg/l).

TABELLA IV.

Fraz.	Solvente	Volume cm^3	Colore	Peso mg.
1	Metiletilchetone + 1% metanolo	200	—	—
2		50	giallo debole	5
3		50	giallo debole	9
4		50	giallastro	10 4
5		50	giallastro	11.5
6		50	giallastro	12,2
7		50	—	5,1
8		50	—	6 0
9		50	—	4 5
10		50	—	3,7
11		50	—	2 3
12		50	—	10 1
13		50	—	12,4
14		50	giallo chiaro	18 6
15	Metiletilchetone + metanolo 1,5% . . .	50	—	21,2
16		50	—	7,9
17		50	—	20,6
18		50	giallastro chiaro	28 3
19	Metiletilchetone + metanolo 2%	50	—	8 6
20		50	—	14,5
21		50	giallastro	21,2
22		50	—	10,2
23		50	—	11,5
24		50	—	10,4
25	Metiletilchetone + metanolo 3%	50	giallo	46,1
26		50	—	51 6
27		50	—	25,7
28		50	giallo chiaro	7,8
29		50	incolore	—
30		50	incolore	—

toposti alla cromatografia su carta uni- e bi-dimensionale impiegando acetato di etile — piridina ed acqua (7,5-2,3-1,65) e metil-etilchetone saturato con acqua + 1% di metanolo proposti da KARRER e coll. ([7]), e noti rispettivamente anche con la notazione di solventi C e D, in modo da ottenere dati confrontabili con quelli dei suddetti Autori.

La cromatografia unidimensionale con il solvente acetato di etile-piridina-acqua ha dato numerose macchie che sono state rivelate con diversi reattivi specifici e i cui R_x corrispondono agli R_c per i vari gruppi di alcaloidi per questo solvente. Tali dati costituiscono una notevole base di primo orientamento (vedi fig. 2).

Ulteriore conferma viene data dalla cromatografia bidimensionale con acetato di etile-piridina-acqua e metil-etilchetone saturato di acqua + 1% di metanolo che permette di mettere in rilievo con maggior sicurezza la presenza di ventitre alcaloidi appartenenti a quattro e forse a cinque gruppi diversi. In particolare sono presenti molto probabilmente la C-calebassina, la C-curarina il gruppo della tossiferina con il C-alcaloide K, l'alcaloide J, la C-fluorocurinina e la C-fluorocurarina.

Nella fig. 1 è riportata la cromatografia bidimensionale di questi alcaloidi. Inoltre per rendere più sicuro e sensibile questo metodo abbiamo sottoposto la miscela dei cloruri degli alcaloidi della S. trinervis a una cromatografia di partizione su colonna di polvere di cellulosa, ed abbiamo eluito con metil-etil-chetone saturo di acqua + 1% di metanolo. Si sono così ottenute 24 frazioni che sono state sottoposte a cromatografia unidimensionale con acetato di etile-piridina-acqua e sono state raggruppate quelle che mostravano un cromatogramma analogo, ottenendosi così sei frazioni fondamentali, che sono state in seguito evaporate a secchezza e sottoposte a prove farmacologiche e alla cromatografia su carta (vedi tab. IV e V).

TABELLA V.

Frazioni	Aspetto	Peso mg.	Attività mg/kg
I	giallo	34,8	10
II	giallo-rosso	80,5	5
III	rossastro	49,2	2
IV	giallastro	76,6	5
V	rossastro resinoso	23,7	5
VI	rossastro resinoso	65,8	5

In tal modo è possibile allontanare la maggior parte delle resine che accompagnano sempre gli alcaloidi e ne intralciano notevolmente il riconoscimento.

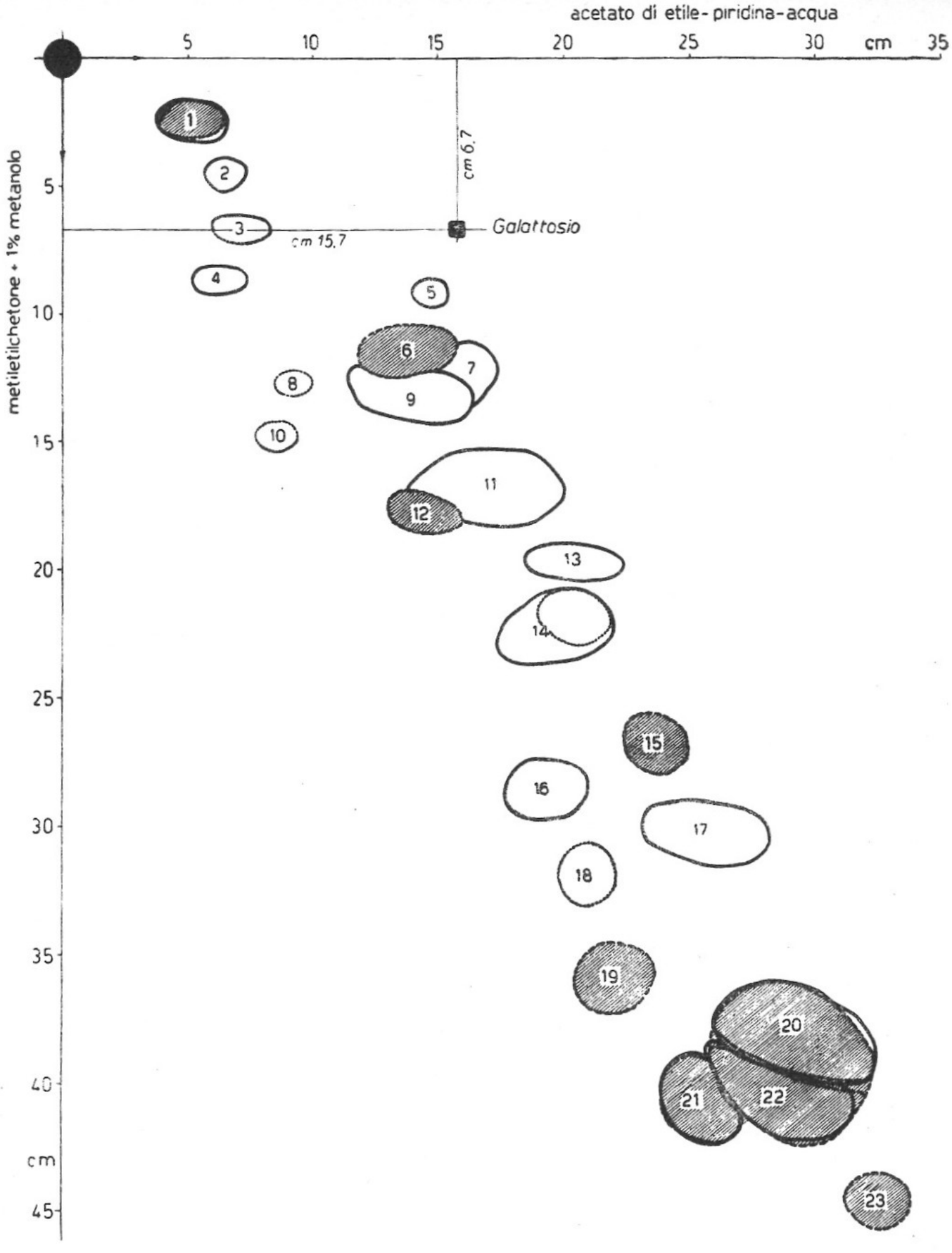

FIG. 1. — Cromatogramma bidimensionale continuo di 2 mg di cloruri degli alcaloidi della *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart.

I. Solvente: acetato di etile-piridina-acqua (15 ore).

II. Solvente: metil-etilchetone saturo d'acqua + 1% di metanolo (16 ore).

Leggenda: Area delimitata da linea continua: colorazione positiva con solfato cerico; area delimitata da linea punteggiata: assorbimento alla luce di Wood; area tratteggiata delimitata da linea a trattini: fluorescenza alla luce di Wood.

I numeri si riferiscono alle proprietà riportate nella tab. VI.

TABELLA VI.

Macchia N.	U. V.	Reazioni cromatiche con					Sostanza probabile
		$Ce(SO_4)_2$	Ald. cinn.	HCl	$FeCl_3$	HNO_3	
1	Fl. celeste	rosso bluastro	rosso chiaro	—	—	—	Alcaloidi del
2	—	giallastro	—	—	—	—	gruppo B, C, D (?)
3	—	rosa	—	—	—	—	
4	—	rosa giallo	—	—	—	—	
5	—	rosso	—	—	—	verde giallo	
6	Fl. blu verde	—	—	—	—	—	
7	—	blu viola	rosso viola	bruno chiaro	—	rosso	C-calebassina
8	Ass. verde chiaro	—	rosa	—	—	—	
9	—	rosso viola	viola	arancione	bluastro	—	C-alcaloide H
10	Ass. verde	—	—	—	—	verde giallo	
11	—	blu rosso	blu	blu viola	—	—	C-curarina
12	Ass. giallo	rosa debole	beige	marrone	blu acciaio	—	C-alcaloide J
13	—	rosa	—	—	—	—	
14	Ass. giallo verdastro	blu viola	blu	—	bluastro	—	C-alcaloide K
15	Fl. blu verde	rosso	—	—	—	—	
16	—	rosa	—	—	—	—	
17	—	rosso blu	—	bruno chiaro	—	verde	
18	—	giallo	—	—	—	—	
19	Fl. verde	—	—	—	—	—	
20	Fl. verde	blu violetto	—	—	—	—	
21	Fl. gialla verdastra	rosso carminio	giallo	giallastro	—	—	C-fluorocurinina
22	Fl. celeste	azzurro chiaro	giallo chiaro	giallastro	—	—	C-fluorocurinina
23	Ass. giallo verde	rosso	rosa chiaro	giallo bruno	—	—	C-alcaloide L (?)

I sei cromatogrammi di queste frazioni, riportati nella fig. 3, confermano pienamente quanto si era già osservato nella cromatografia su due dimensioni.

Per concludere si può dire che data la difficoltà dell'identificazione botanica e della diversità dei metodi di estrazione e delle proprietà farmacologiche ci è sembrato importante nello studio dello *Strychnos* brasiliano di potere disporre di un metodo standard cui riferire tutti i dati sulla tossicità globale delle varie piante. A questo scopo il metodo di estrazione con acido tartarico sembra dare i migliori risultati.

Inoltre accanto ad alcaloidi curarizzanti si è trovato nella *S. glabra* un alcaloide ad azione centrale paralizzante. In nessuna delle sette specie di Strychnos studiate sono stati riscontrati principi stricnizzanti. Le prove cromatografiche hanno potuto chiaramente mettere in evidenza che in una sola pianta sono presenti 23 alcaloidi. Si può inoltre sottolineare che tre di questi, e precisamente gli alcaloidi H e K del gruppo della tossiferina e l'alcaloide J sono stati per la prima volta ritrovati in una pianta.

Il notevole numero di alcaloidi trovati nella *S. trinervis* conferma quanto è stato osservato per la *S. Mitscherlichii* e dimostra che la varietà degli alcaloidi nei curari indiani non è necessariamente legata al numero e alla diversità delle piante impiegate.

PARTE SPERIMENTALE

Strychnos esaminati in questo lavoro e cioè le *S. divaricans* Ducke *S. rubiginosa* D. C., *S. trinervis* (Vell.) Mart. sono stati raccolti da uno di noi (A.D.) nella zona di Recife (Pernambuco) nel luglio 1952. La *S. Froesii* Ducke nel febbraio dello stesso anno a Manaus, la *S. glabra* Sagot, la *S. guianensis* (Aubl Mart) e la *S. tomentosa* Benth. nell'aprile 1952 a Belém.

Estrazione delle piante per effettuare le prove farmacologiche

a) 20 g di corteccia di *Strychnos* ben seccata vengono intimamente mescolati con 10 cm^3 di soluzione all'1% di acido tartarico e lasciati per tre ore. La polvere umida viene poi disposta in un percolatore e aggiunta tanta soluzione di acido tartarico all'1% fino a che appaiono le prime gocce intensamente colorate e il liquido non ricopre tutta la polvere di *Strychnos*.

Si lascia poi a riposo per 24 ore quindi si inizia la percolazione a una velocità di 20-25 gocce al minuto.

Quando sono passati 450 cm^3 non si ha generalmente più precipitato con il reattivo di Tanret, e il percolato non dà nemmeno reazione con una soluzione di solfato cerico.

Il percolato si concentra nel vuoto a 20 cm^3, si filtra per allontanare il precipitato costituito da tartrati di calcio e di potassio, quindi si neutralizza il filtrato con potassa. Si separa così altro tartrato potassico. Il percolato neutralizzato si porta a 25 cm^3 e si prelevano di questi 5 cm^3 per le prove farmacologiche (1).

I rimanenti 20 cm^3 vengono poi portati a pH 8 con KOH e dibattuti con cloroformio. Si formano in questo caso spesso emulsioni che si possono solo rompere per centrifugazione. L'estratto cloroformico viene poi evaporato a secco a pressione ridotta, e quindi ripreso con una soluzione tartarica all'1%. Si ha così un nuovo estratto (IV) per le prove farmacologiche.

b) su un'altra porzione di polvere di corteccia (20 g) si effettua in modo analogo una percolazione con acqua distillata (II) quindi con metanolo contenente il 3% di acido acetico (III) ([5]).

Le tossicità degli estratti I-IV sono riportate nella tab. III. Essi sono stati effettuati sul topino. Egualmente nella tab. III si determina l'azione curarica sul *Rectus abdominis* del rospo.

Estrazione della Strychnos trinervis

Grammi 200 di corteccia finemente polverizzata di *S. trinervis* vengono sottoposti alla percolazione con acido tartarico come sopra indicato per il metodo generale.

Nello schema I è riportata la separazione degli alcaloidi di questa *Strychnos* e la loro trasformazione in cloruri.

Su una parte meno pura di un'estrazione preliminare (DML = 5 mg/kg) è stata effettuata la cromatografia di partizione su polvere di cellulosa, secondo il procedimento sviluppato da Karrer e coll. ([7]).

Cromatografia di partizione dei cloruri degli alcaloidi su una colonna di cellulosa

400 mg di cloruri degli alcaloidi vengono cromatografati su 200 g di polvere di cellulosa « Whatman, Standard grade ». A questo scopo si dispone in un tubo di vetro del diametro di circa 5 cm la polvere di cellulosa previamente bagnata nel solvente e compressa nel miglior modo possibile.

La colonna completa ha un'altezza di 20 cm (1 g di cellulosa in polvere corrisponde a circa 2 cm^3). Si lava quindi la colonna con 8-ossichinolina ([25]) e quindi durante 20 ore con solvente puro, quindi si lascia con il rubinetto chiuso per 12 ore a contatto con il solvente. Nel frattempo si è fatto adsorbire la soluzione metanolica dei cloruri degli al-

([25]) Buchanan, Johnson, Mills e Todd, J. Chem. Soc., 2850 (1950).

Schema 1.

Strychnos trinervis: corteccia polverizzata 200 g

↓

Percolato tartarico: 4-5 litri

si concentra a 12 mm e a 35°; si allontanano per filtrazione i tartrati che si sono separati.

↓

Filtrato acido: 200 cm³

si neutralizza con KOH; si filtra per separare il tartrato potassico, si concentra nuovamente nel vuoto.

↓

Filtrato neutro: 100 cm³

si alcalinizza con KOH a pH 8, si estrae con $CHCl_3$ (450 cm).

↓ ↓

Estratto cloroformico (alcaloidi terziari) si evapora $CHCl_3$ 420 mg di una polvere bruna. Se ne discioglie una parte in acido tartarico all'1% e se ne saggia la tossicità.

Filtrato neutro (alcaloidi quaternari in soluzione acquosa)

si porta con HCl a pH 2 si aggiungono 5 g di sale di Reinecke in 33 cm di CH_3COOH e in 66 di H_2O. Sul filtrato si ripete la precipitazione con sale di Reinecke al 5%.

↓

Reineckati grezzi: 12,8 g

si mettono in 140 cm³ di acetone e quindi si filtrano; quindi nuovamente con 50 cm³ di acetone per 3 ore, quindi si filtra. Il residuo si pesta accuratamente in mortaio con 5 porzioni ognuna di 5 cm³ di acetone. Le soluzioni acetoniche vengono poi trattate con 500 cm di acqua bollente. Il residuo rosso si scioglie in 40 cm³ di acetone e si tratta quindi con 120 cm di acqua.

Dopo raffreddamento si raccoglie si decanta e l'olio rosso si secca in essiccatore a vuoto.

↓ ↓

Reineckati sol. di H_2O Non ancora studiati.

Reineckati solubili in acetone (4,1 g).

Trasformati mediante Ag_2SO_4 e $BaCl_2$ nei cloruri. Per allontanare il $BaSO_4$ si filtra la soluzione attraverso Norite. Dopo di questo si evapora l'acqua a 35° ed il residuo si asciuga nell'essiccatore, poi si estrae a caldo con 4 porzioni di alcool assoluto. I cloruri così ottenuti, disciolti in poco alcool vengono fatti passare per una colonna larga contenente 100 g di allumina seccata a 100° e previamente trattata con acido cloridrico. Poi si lava con alcool al 50% fino a che l'eluato non da più reazione con solfato cerico. Si ottengono in questo modo 355 mg di

↓

Cloruri di alcaloidi di colore giallo-verde.

DML = 1 mg/kg.

caloidi su 10 g di polvere di cellulosa quindi la polvere si secca nel vuoto a 30° sotto continua agitazione; dopo avere pestato e setacciato la polvere viene lasciata a contatto per 14 ore con i vapori del solvente. La polvere così trattata si trasferisce nella colonna già preparata e si comprime energicamente, poi si inizia lo sviluppo del cromatogramma, mantenendo livello costante e una velocità di 50 gocce al minuto. Conviene che la colonna durante l'operazione sia riparata dalla luce, il che si può realizzare ricoprendola con carta argentata.

Come solvente si impiega metil-etilchetone acquoso, esente da perossidi contenente dall'1 al 3% di metanolo.

Nella tab IV sono riportati i dati per le singole frazioni. Di ogni singola frazione è stato effettuato il cromatogramma unidimensionale su carta impiegando come solvente etere acetico-piridina-acqua (7,5-2,3-1,65). Le frazioni che mostravano analogo comportamento cromatografico sono state riunite e saggiate farmacologicamente e quindi sono stati effettuati cromatogrammi unidimensionali. Nella tabella V sono riportate queste frazioni assieme alla loro attività biologica.

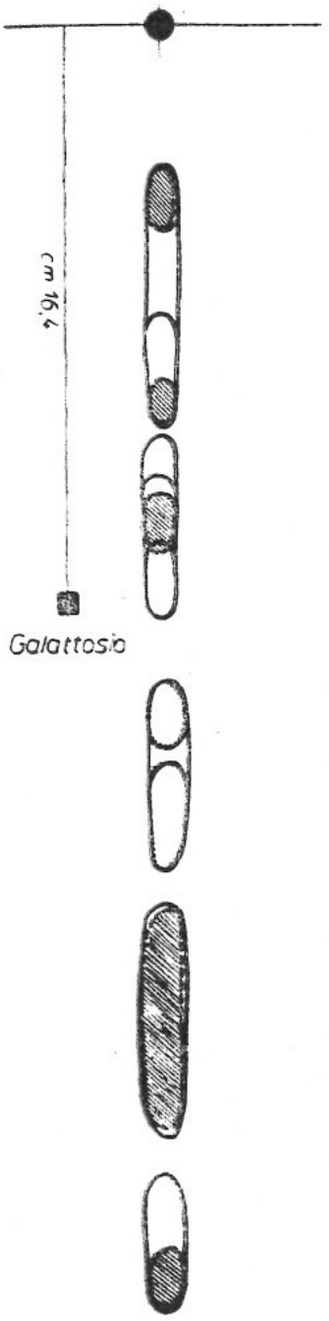

FIG. 2. — Cromatografia unidimensionale continua (15 ore) di 1 mg di cloruri degli alcaloidi della *Strychnos trinervis* (Vell.) Mart.
Solvente: acetato di etile-piridina-acqua.
Sviluppo con reattivi riportati nella tab. VI dopo osservazione alla luce di Wood.
Leggenda delle macchie come nella fig. 1.

CROMATOGRAFIA SU CARTA

I cromatogrammi su carta vengono effettuati nel modo consueto impiegando carta Whatman 1 (57 cm × 46 cm) a 25°.

La soluzione degli alcaloidi viene disposta a 8 cm dal bordo avendo cura che formi un cerchio di 6-12 mm di diametro.

Per i cromatogrammi unidimensionali si adoperano 0,5-1 mg di alcaloidi e i bidimensionali 1-2 mg di cloruri di alcaloidi.

Le carte, così preparate, vengono lasciate nella cassetta in ambiente saturo di solvente, fino a raggiungere l'equilibrio (sei ore circa). Quindi

si inizia lo scorrimento aggiungendo il solvente nelle vaschette a mezzo di un dispositivo che evita di aprire la cassetta.

Si impiegano etere acetico piridina e acqua (7,5-2,3-1,65) e metil-etilchetone + 1% di metanolo. E' necessario impiegare solventi purissimi o pro analysi. La piridina va in ogni caso ridistillata prima di effettuare la cromatografia mentre il metil-etilchetone va liberato dai perossidi.

La durata dei cromatogrammi è di 12-14 ore per il solvente acetato di etile-piridina-acqua e di 15-16 ore per metil-etilchetone + 1% metanolo.

Dato che si deve fare una cromatografia continua per la bassa velocità degli alcaloidi, conviene ritagliare i bordi delle carte con una forbice tagliacampioni, in modo da facilitare lo sgocciolamento e di evitare una troppo lunga permanenza del solvente sulla carta.

Dopo avere asciugato i cromatogrammi a 25°, si osservano prima alla luce di Wood e in tal modo si possono rilevare le macchie che sono fluorescenti e quelle che assorbono, quindi si sviluppano con i seguenti reattivi:

1) solfato cerico 1% in acido solforico 2 N ([7]).
2) aldeide cinnamica ed acido cloridrico ([7, 16]).
3) acido cloridrico gassoso.
4) cloruro ferrico in acido solforico.
5) acido nitrico conc.
6) iodio vapori ([26]) o soluzione di iodio ([6]).

Le diverse macchie vengono confrontate con quelle riportate nelle medesime condizioni da Karrer ([7]) sia considerando i valori dell'R_X sia direttamente in base alle reazioni cromatiche: in tal modo si riescono ad identificare abbastanza bene numerosi alcaloidi.

I valori dell'R_X si ottengono di confronto con la macchia del galattosio che viene cromatografato insieme agli alcaloidi. Per raffrontare i nostri valori con quelli di Karrer ([7]) dato che questo Autore riporta per gli alcaloidi un R_C riferito alla C-curarina, ma anche l'R_C del galattosio, è possibile mediante un semplice calcolo riferire i nostri dati a quelli della letteratura

$$\frac{R_C \text{ alcaloidi}}{R_C \text{ galattosio}} = R_X \text{ (calc.)}$$

Nei nostri cromatogrammi si potrà calcolare in base alla posizione della macchia degli alcaloidi e a quella del galattosio un R_X (trov.).

([26]) Marini-Bettòlo e Guarino, Exp., 6, 309 (1950).

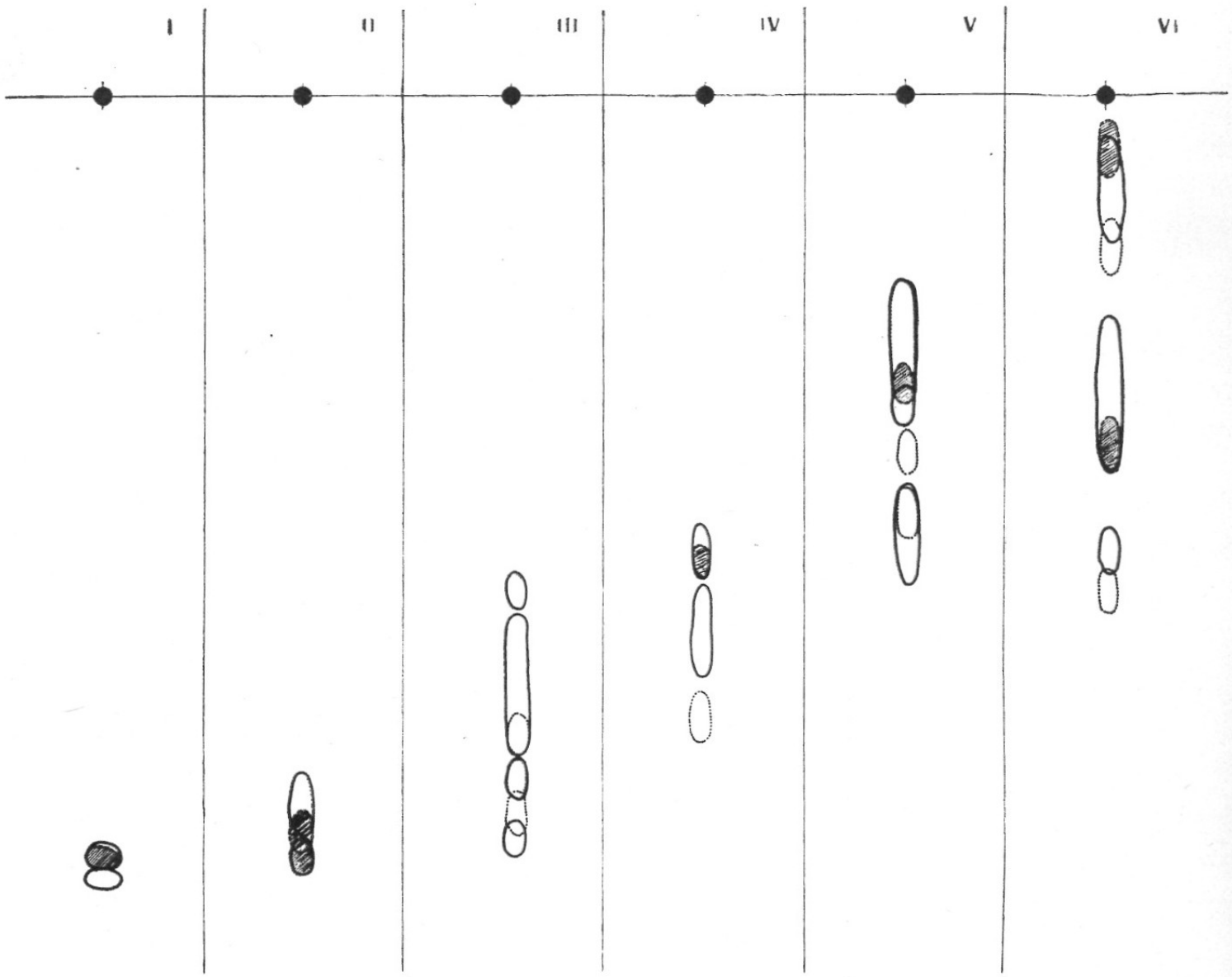

FIG. 3. — Cromatografia unidimensionale continua (15 ore) delle frazioni riportate nella tab. V. Solvente: acetato di etile-piridina-acqua. Sviluppo: cfr. fig. 1. Leggenda delle macchie come fig. 1.

Per uno stesso alcaloide naturalmente devono coincidere i due valori R_x (calc.) e R_x (trov.).

Avendo trovato per il galattosio uno scorrimento di 6,7 cm dall'origine con il solvente metil-etilchetone saturo di acqua + 1% di metanolo e di 15,7 cm per il solvente piridina-acetato di etile-acqua si sono calcolati i seguenti R_x per i diversi alcaloidi: per es. per la C-curarina si ha, con il primo solvente R_x 2,61: in base ai calcoli dai dati di KARRER si avrebbe R_x : 2,70; per il secondo solvente R_x (trov.) 1,16 e R_x (calc.) 1,00. E ancora per l'alcaloide K per il primo solvente R_x (trov.) 3,36 e R_x (calc.) 3,29; per il secondo solvente R_x (trov.) 1,28 e R_x (calc.) 1,11. Per la fluorocurinina R_x (trov.) 6,18 e R_x (calc.) 6,02 per il primo solvente e per il secondo R_x (trov.) 1,58 e R_x (calc.) 1,60.

Le ricerche di cui abbiamo riferito sono state rese possibili grazie alla comprensione e all'attiva collaborazione trovate nel Conselho Nacional de Pesquisas do Brasil: di questo ringraziamo particolarmente il suo Presidente, Ammiraglio Alvaro Alberto e il Prof. C. Chagas, Direttore del Instituto de Biofisica da Universidade do Brasil.

I nostri ringraziamenti vanno anche all'U.N.E.S.C.O. che ha affidato a uno di noi (D. B.) una missione in Brasile e alla Schweizerische Stiftung fur Stipendien auf dem Gebiet der Chemie che ha reso possibile la partecipazione di uno degli autori (K. A.) a tali ricerche.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di chimica terapeutica.
Belém (Brasile). — Instituto Agronomico do Norte.